

(Aus dem Hygiene-Institut der Universität Zürich)
(Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. A. Grumbach)

Spielt die «Surface Phagocytosis» in der Sulfonamidtherapie die ihr von Wood zuge dachte Rolle?

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Zürich

vorgelegt von

Max Haemmerli

von Lenzburg

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. H. Mooser



Zürich 1949

VERLAG VON S. KARGER IN BASEL



Sonderdruck aus „Schweizerische Zeitschrift für
Pathologie und Bakteriologie“ Vol. XII, Nr. 4 (1949)

Die Autoren, die sich für den Wirkungsmechanismus der Sulfonamide (Sa) interessieren, nehmen heute mehrheitlich einen nurmehr bakteriostatischen Einfluß an. Das bedeutet zwar einen Fortschritt — der aber fast automatisch eine Reihe weiterer Fragen zur Folge hatte, deren Beantwortung noch viele Kontroversen auslösen wird. So können wir z. B. *Dubos* (1) nicht beistimmen, wenn er offenbar in Anlehnung an *Hirsch* (2) annimmt, daß die Sa, weil sie die katabolischen Prozesse weitgehend unbeeinflußt lassen, aber das Bakterien-«Wachstum» hemmen, in den Anabolismus eingreifen. Dieser Irrtum ist wohl nur dadurch möglich geworden, daß *Dubos* Wachstum und Vermehrung nicht auseinanderhält. Die Vermehrung — d. h. das Teilungsvermögen, aber auch nur es — ist aufgehoben, das Assimilationsvermögen aber geht, wie die von den verschiedensten Seiten beschriebenen Riesenformen zeigen, für geraume Zeit ungestört weiter. Das aber heißt schließlich, daß das Teilungs- oder Vermehrungszentrum der Zelle den Angriffspunkt für die Sa darstellt — eine Stelle, die schon vor Jahrzehnten von *V. Henry* vermutet, deren Existenz nun durch die Bestrahlungsversuche mit harten Strahlen von *Jordan* (3), mit γ -Strahlen von *Lea*, *Haines* und *Bretscher* (4) und die morphologischen Untersuchungen von *Robinow* (5) zum mindesten sehr wahrscheinlich gemacht wurde.

Eine weitere Frage betrifft den Mechanismus des Heilungsvorganges, wo es immer noch zu entscheiden gilt, ob die Bakteriostase an sich hierfür ausreicht oder ob den Zellen und Säften des Makroorganismus eine diesbezüglich additive Funktion zukommt.

Daß wir über die intimeren Vorgänge, die zur Bakteriostase führen, noch so gut wie nichts wissen, hat *Grumbach* (6) erst vor

Eingegangen: 19. 9. 1948.

kurzem wieder dargetan. Seine auf *McLeod*, *Mayr-Harting* und *Walker* (7) zurückgehenden Untersuchungen belegten erneut die Berechtigung der *Dubosschen* Forderung (l. c. 277), daß eine umfassende Konzeption über die Wirkungsmechanismen von Desinfektionsmitteln und Chemotherapeuticis nicht nur die Inhibitoren essentieller Stoffwechselvorgänge, sondern auch «the enzymic and chemical reagents which can selectively alter or destroy vital morphological structures, as well as the non specific physico-chemical reactions which affect indiscriminately the protoplasmic constituents of all living cells» zu berücksichtigen hat.

Über eine allfällige Beteiligung der Wirtszellen am Heilungsvorgang orientieren die nachstehenden Ausführungen.

Domagk (8) ist überzeugt, «daß dem direkten Angreifen der Sa. an den Bakterien eine große Bedeutung zukommt, daß der endgültige Heilungseffekt aber von der Mitwirkung des gesamten Organismus abhängig ist, besonders von der erhaltenen Funktion der Leukozyten und der histiozytären Zellen und noch andern anatomischen Bedingungen», oder (9): «Die Therapie mit den Sa. ist keine Therapie magna sterilisans im üblichen Sinne! Denn sehr wesentlich bleibt bei dieser Therapie, trotz des primären Angreifens dieser Substanzen oder ihrer Spaltprodukte an den Bakterien, die Mitwirkung der natürlichen Abwehrkräfte des Makroorganismus zur endgültigen Vernichtung der in ihn eingedrungenen Krankheitserreger. Ohne Mitwirkung des Organismus keine restlose Vernichtung der Bakterien.»

Auch *Grumbach* (10) glaubte dem Gesamtorganismus für die Heilung eine Bedeutung beimessen zu müssen, läßt im Gegensatz zu allen anderen Autoren aber offen, wo dieser Faktor zu suchen ist, «si une véritable septicémie ne profite plus de la chimiothérapie (par les sulfamidés), c'est qu'un élément intervient dont nous ignorons la nature».

Wenn die von *Levaditi* und *Vaisman* (11) erstmalig aufgedeckte Phagozytose von unter Sa-Wirkung stehenden Streptokokken kaum je bestritten, aber sehr oft bestätigt wurde (*Spink* und *Keefer*, 12; *Bliss* und *Long*, 13; *Hoare*, 14; *Haag*, 15; *Winkler*, 16, u. a. m.), so trifft das, was nicht übersehen werden darf, für die ebenfalls von *Levaditi* beschriebene Pneumokokkenphagozytose nicht zu. Damit hängt aber auch die von *Levaditi*, *Vaisman* und *Krassnoff* (17) für die Sa-Wirkung postulierte Behin-

derung des Kapselbildungsvermögens in der Luft — eine Annahme, die an sich nicht sehr glücklich war, denn schließlich gibt es, wenn die für die Bakteriostase benötigte Sa-Konzentration erreicht ist, eben überhaupt keine neuen Pneumokokken mehr, womit aber auch «l'extériorisation de leur potentiel capsulogène» bedeutungslos geworden ist. Dazu kommt, daß eine rechtzeitige Aufhebung des Sa-Effektes — sei es durch Verdünnung, sei es durch Zusatz eines Antagonisten (PAB) — die Vermehrung wieder zuläßt, die Nachkommen dieser Pneumokokken aber in gleicher Weise wie die mit Pneumokokkenserum behandelten (*Oelrichs*, 18) wieder kapselhaltig und damit infektionstüchtig und phagozytoseresistent sind. Wäre dem nicht so, so wäre die Umwandlung von S- in R-Stämme wesentlich einfacher.

Die Frage kann somit nur lauten, was mit den kapselhaltigen in ihrer Vermehrung gehemmten Keimen geschieht. So gestellt, haben sie *Neufeld* und *Bär* (19) zu beantworten versucht. Sie gingen dabei von der Beobachtung aus (*Reiner*, 20), daß es außer den spezifischen Immunsereen eine große Zahl von Stoffen gibt, «die die merkwürdige Eigenschaft haben, Bakterien zur Phagozytose vorzubereiten, und zwar ohne sie dabei abzutöten oder sonst sichtlich zu schädigen» (Tannin, Neutralsalze mit 3—4-wertigen Kationen, wie z. B. Fe-Alaun). Sie hatten nun einerseits Leukozyten und andererseits Bakterien mit Sa-Plasma vorbehandelt und festgestellt, daß im Phagozytose-Versuch «nur im Falle einer Sa-Vorbehandlung der Bakterien (nicht der Leukozyten) verstärkte Phagozytose eintrat». Auf Grund dieser die Versuchsergebnisse *Levaditis* modifizierenden Befunde glaubten sie in Anlehnung an *Schloßberger* (21) die Sa-Wirkung mit der der Bakteriotropine — d. h. den spezifischen die Phagozytose fördernden Serum-Antikörpern — identifizieren zu dürfen.

Diesem auf in-vitro-Versuchen beruhenden Analogieschluß steht nun aber die Tatsache entgegen, daß es — von den Mitteilungen *Levaditis* abgesehen — bisher nie gelungen ist, in den Peritonealausstrichen von pneumokokkeninfizierten und Sa-behandelten Mäusen eine auch nur einigermaßen ins Gewicht fallende Phagozytose festzustellen. Auch *Lushbaugh* und *Canon* (22), die die Sa-Wirkung auf Pneumokokken am Kaninchen in der Dermalinfektion untersuchten, kamen zum Schluß: «The effect of the drug presumably is upon the bacterial cell body rather than the capsule. No evidence was found that phagocyto-

sis plays the conspicuous role in their disposal that it does in acquired immunity.»

Zu einem den *Neufeld-Bärschen* in-vitro-Versuchen widersprechenden Ergebnis war im übrigen auch *Hofmann* (23) gekommen. Er ließ *Prontosil* auf bekapselte und unbekapselte Sarcinen einwirken und stellte fest, daß die bekapselte *Sarcina tetragena* phagozytoseresistent blieb. Gegen eine wesentliche Bedeutung der Phagozytose sprechen auch die Ergebnisse der von *Grumbach* und *Grilicheß* (24) mitgeteilten in-vitro-Versuche mit virulenten Streptokokken. Sie hatten gefunden, daß die verschiedensten Sa in durch Schütteln mit Glasperlen defibriniertem — also doch wohl leukozytengeschädigtem — leukozytenarmem Blut besser wirken als in Citrat- oder gar Liquoidblut.

Schließlich war es auch *W. B. Wood* u. Mitarb. (25) nicht gelungen, in in-vitro-Versuchen, in denen virulente Pneumokokken nach mehrstündiger Sulfapyridineinwirkung mit frischem defibriniertem Rattenblut zusammengebracht worden waren, eine Phagozytose nachzuweisen. Das dürfte für unsere Fragestellung noch bedeutsamer sein als die Mitteilungen von *Friedemann* und *Schönfeld* (26), nach denen völlig unbewegliche Leukozyten noch zu phagozytieren vermögen oder «in physikalischem Sinne als tot zu bezeichnende» kapselhaltige Pneumokokken selbst nach Hitzeabtötung (60°) nicht phagozytiert werden (*Ward* u. *Enders*, 27). *Wood* u. *Irons* (28) hatten ferner festgestellt, daß Sulfapyridin Pneumokokkenpneumonien bei der Ratte auch dann zu heilen vermag, wenn die Tiere zuvor durch Röntgenbestrahlungen leukopenisch gemacht worden waren. Das ist eine Beobachtung, die dem ärztlichen Erlebnis besonders nahekommt, verfügt doch die Klinik über eine reiche Erfahrung von mit Leukopenie einhergehenden Pneumonien (*Hegglin*, 29), die — wenn man auch geneigt ist, hierin ein prognostisch ungünstiges Zeichen zu sehen — auf eine energisch durchgeführte Sa-Therapie keineswegs schlechter ansprechen als die von einer Leukozytose begleiteten.

Alle diese Beobachtungen berechtigen u. E. zu der zunächst vielleicht ketzerisch klingenden Frage, ob den Leukozyten bei den durch Sa erzielten Heilungserfolgen überhaupt eine Bedeutung zukommt. Ihre Beantwortung wird um so eindeutiger ausfallen, je zuverlässiger gezeigt werden kann, daß eine für einige Zeit aufrechterhaltene Bakteriostase an sich mit oder ohne morphologische Läsion zur Bakterienabtötung führt.

Das haben nun aber einmal die klassischen Sublimatversuche von *Fildes* (30), die daraus hervorgegangenen Untersuchungen *Grumbachs* (31) mit Hg und anderen Schwermetallsalzen sowie die von *Baker, Harrison* u. *Miller* (32) mit quaternären Ammoniumsalzen einwandfrei dargetan. Diese Desinfektionsmittel dürfen — nachdem es nunmehr feststeht, daß es sich auch bei ihnen um reversible bakteriostatische Wirkungen handelt — ohne weiteres mit den Sa verglichen werden. Eine Brücke zwischen den beiden Substanzgruppen (Sa und Desinfektionsmittel) wird — sofern diese nötig erscheint — im übrigen durch das Penicillin geschlagen, das — wie zahlreiche Autoren gezeigt haben (s. *McLeod* u. *Stone*, 33) —, trotzdem im Organismus nurmehr bakteriostatische Konzentrationen erreicht werden, in seiner Wirkung ebenfalls unabhängig von Immunmechanismen ist.

Dank den Versuchen von *Harris* und *Miller* (34) erübrigt es sich aber, bei Analogien stehenzubleiben. Sie versenkten in Kollodiumsäckchen eingeschlossene haemolytische Streptokokken in die Bauchhöhle des Kaninchens und behandelten die Tiere mit Sa. Dabei gingen große Mengen von Streptokokken unter Ausschluß jeder phagozytären Komponente zugrunde, womit die von *Harrison* (35) verfochtene These, daß eine bakteriostatische Wirkung an sich nicht ausreicht, um eine Infektion zu erledigen, widerlegt ist. Dadurch, daß die Autoren im Kollodiumsack häufig nicht einmal präzipitierbares Eiweiß fanden, ließ sich auch die Beteiligung allfällig früh entstandener Antikörper ausschließen.

Dieser Frage hat im übrigen *Harrison* (l. c.) seine besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Bei mit Pneumokokken Typ I intradermal infizierten und teils mit Sa (Sulfapyridin, Sulfadiazin, Sulfamerazin), teils mit Penicillin behandelten Kaninchen verfolgte er die lokale Läsion und bestimmte außer dem heute nicht mehr als beweisend anzusehenden Agglutinititer u. a. den Titer der schützenden Antikörper.

In Vorversuchen konnte er zeigen, daß die durch abgetötete Vakzinen erzielten Antikörpertiter durch zusätzliche Gaben von Penicillin und Sulfapyridin nicht beeinflußt werden.

Bei den Infektionsversuchen vermochte das nach 4 h applizierte Penicillin die Infektion glatt zu coupieren, wogegen das nach 4 h verabreichte Sulfapyridin die Infektion nicht vollständig aufzuhalten vermochte. Im Serum der Penicillintiere ließ sich dementsprechend keine Spur von Antikörpern nachweisen,

wogegen die Sulfapyridintiere hohe Antikörpertiter lieferten. Setzte die Behandlung 24 h nach der Infektion ein, so war das Ergebnis umgekehrt, jetzt waren die Antikörpertiter der Sulfapyridintiere geringer (fortlaufende Absorption durch die vorhandenen Keime) und die der Penicillintiere hoch.

Daß das rascher zur Wirkung kommende Penicillin 24 h nach der Infektion appliziert immunologisch denselben Erfolg zeitigt wie das längere Anlaufzeit benötigende Sulfapyridin, ist ohne weiteres verständlich. Die Tatsache, daß unter diesen optimalen Verhältnissen schützende bakterizide und die Phagozytose fördernde Antikörper nachgewiesen werden können, spricht wohl für eine die Chemotherapie unterstützende immunisatorische und dann auch die Phagozytose fördernde Wirkung, vermag aber die Tatsache nicht aus der Welt zu schaffen, daß ein sehr gutes Chemotherapeuticum wie das Penicillin früh genug eingesetzt die Heilung auch allein zu bewerkstelligen vermag. Ob das für die Sa bei richtiger und entsprechend lang fortgesetzter Dosierung nicht auch zutrifft, ist aus zeitlichen Gründen direkt nicht zu beantworten. Die Tatsache aber, daß unter Sa- und Penicillinwirkung Antikörper und selbst schützende entstehen können, darf jedenfalls nicht dazu führen, eine Erscheinung, die sicher *post hoc* ist, als *propter hoc* zu werten.

Entgegen allen Erwartungen hat nun aber das Pendel in der Frage der Leukozytenfunktion im Rahmen der Sa-Heilung dank den Untersuchungsergebnissen von W. B. Wood und seinen Mitarbeitern (36) nochmals nach der anderen Seite ausgeschlagen. Wood (37) glaubt nämlich, für die in der Diskussion gefallenen Pro und Contras eine ebenso einfache wie unerwartete Lösung gefunden zu haben: Wood et al. beobachteten zunächst bei mit Pneumokokken I infizierten und sulfapyridinbehandelten Ratten in bestimmten Lungenzonen eine relativ intensive Phagozytose, die sie an Friedländer-infizierten und Sa-behandelten Tieren zu bestätigen vermochten. Die bakteriostatische Wirkung der Sa erschlossen sie aus einer Einstellung der Vermehrung und morphologischen Degenerationszeichen an einzelnen Keimen. Die Phagozytose wird im Vergleich zu dem auch bei unbehandelten pneumonischen Ratten in den Zonen der Konsolidation feststellbaren Vorgang als potenziert angegeben. Fraglich ist nur, wie diese Potenzierung erfolgt. Freie humorale Antikörper konnten von Wood et al. im Gegensatz zu Harrison nicht

nachgewiesen werden. Da sich auch für eine unter Sa-Einfluß zustande gekommene Kapselschädigung keine Anhaltspunkte ergaben, kam er auf Grund der nachstehenden Versuchsergebnisse zur Annahme eines «hitherto undescribed mechanism, which is related neither to opsonins nor to capsular injury».

Über Aleuronat-Bouillon gewonnene Ratten-Leukozyten und Makrophagen wurden mit einem virulenten Pneumokokkentyp I bzw. *Friedländer*-Bazillus vermengt. Das in Eis gehaltene Gemisch wurde intrabronchial in die Lungen lebender Ratten, in mit Gelatine-*Locke*-Lösung gespülte präparierte Lungen und schließlich auch in formalinfixierte (24 h 10%) und nachträglich gewaschene Lungen eingebracht und bei 37° gehalten. Schnitte aus allen 3 Versuchsanordnungen zeigten, daß die in den Bronchien und Alveolen gelegenen Leukozyten und Makrophagen in weniger als einer Stunde phagozytiert hatten. Diese Phagozytose war jedoch nicht festzustellen, wenn dasselbe Leukozyten-Bakterien-Gemisch aus rotierenden Glasröhrchen, hängenden Tropfen oder auch Kapillaren von Bronchiendurchmesser untersucht wurde. Daraus hatten die Autoren geschlossen, daß der Vorgang irgendwie mit dem Wesen der Bronchusoberfläche verknüpft sei. Folgerichtig untersuchten sie in vitro andere Gewebe auf die phagozytosefördernde Eigenschaft und stellten fest, daß die Phagozytose auf Bronchial-, Tracheal- und Ösophagus-epithel, der Intima von Aorta und Cava, Lunge, Pleura, Pericard, Endocard, Peritoneum, Leber, Milz, Niere, Mesenterium, Retina, Muskel, geronnenem Plasma, selbst wenn die Gewebe vorgängig 30 Minuten gekocht wurden, nach einer Stunde Bebrütung glatt vor sich ging. Aber auch totes Material, wie Filter-, Fließ- und Glaspapier, Gewebe und Glaswolle, schienen den Leukozyten eine Haftfläche zu bieten, wogegen das Phänomen auf Glas-, Paraffin-, Albumin- und Cellophanunterlage ausblieb. — Die Oberflächenabhängigkeit des Geschehens, der Name «Surface phagocytosis» drängten sich auf.

Die außerordentliche Bedeutung, die einer Bestätigung dieser Beobachtung zukommen mußte, und die Folgerungen, die *Wood*, *Smith* und *Watson* (38) daran knüpften:

“The methods of classical immunology, however, have failed to reveal why untreated patients sometimes recover from pneumococcal pneumonia before specific antibody is demonstrable in their blood sera, why sulfonamide chemotherapy usually causes a crisis several days before immune bodies appear

in the blood and why phagocytes destroy pneumococci in the lungs of patients dying of pneumonia even when the pneumonic lesion contains large quantities of unbound antiphagocytic polysaccharide",

ließen es uns angezeigt erscheinen, diese von Wood et al. aufgestellte Theorie experimentell zu überprüfen. Schließlich war es angesichts dieser sehr eindeutigen Befunde von Wood u. s. Mitarb. schwer zu verstehen, weshalb diese Phagozytose bei den intraperitoneal infizierten und Sa-behandelten Pneumokokkenmäusen bisher nie beobachtet wurde, und das trotzdem das Peritonealepithel nach Wood et al. zu den phagozytosefördernden Oberflächen gehört.

Versuchstechnik.

Wir hielten uns streng an die von Wood und Mitarb. bekanntgegebene Technik und benützen die Gelegenheit, Herrn Kollegen Wood für die Mitteilung einiger weiterer Details zu danken.

Wir arbeiteten mit einem *Pneumokokken-Typ 1* maximaler Virulenz (0,5 ccm einer auf 10^{-9} verdünnten 14stündigen Serum-Bouillonkultur, d. h. 2—5 Keime töteten die Maus nach intraperitonealer Injektion innerhalb 24 h—36 h).

Die *Leuko- und Monozyten* gewannen wir über Ratten und Meerschweinchen durch Injektion einer Mischung von 5 ccm *Trypsinbouillon* und 5 ccm Aq. dest., der 5% Aleuronat beigegeben war. 12—18 h nach der Injektion wurden die Tiere mit Äther getötet und die Bauchhöhle eröffnet und mit eisgekühlter Tyrodelösung¹ gespült. Das Exsudat wurde vorsichtig unter Vermeidung jeglicher Gewebsverletzung abpipettiert. Um die Leukozyten möglichst wenig zu schädigen, haben wir sie im Kühlraum mit einer Handzentrifuge sedimentiert und zweimal in eisgekühlter Tyrodelösung gewaschen.

Die *Pneumokokken* wurden ebenfalls zweimal in Tyrode gewaschen und dann derart mit den Phagozyten vermischt, daß auf ein weißes Blutkörperchen 5—10 Bakterien kamen. Die Aufschwemmung soll so dicht sein, daß in den Ausstrichpräparaten mit Ölimmersion pro Gesichtsfeld 5—10 Zellen zu sehen sind.

Kontaktflächen: Petri-Schalen wurden mit sterilem in Tyrodelösung getränktem Filterpapier ausgekleidet. Darauf gaben wir einige große sterile Deck-

¹ Tyrode-Lösung I (Tyrofusin K.A.):

Natrium-Chlorid NaCl	85,0 g
Kalium-Chlorid KCl	4,2 g
Calcium-Chlorid CaCl_2	2,5 g
Magnesium-Chlorid MgCl_2	0,05 g
Primäres Natriumphosphat NaH_2PO_4	0,05 g
Natriumbikarbonat NaHCO_3	5,0 g
Glycose (puriss)	10,0 g
Aqua dest. (steril)	ad 10 000,0 ccm
pH = 7,3 bis 7,4	

gläsern, auf die das für die Aufnahme des Zell-Bakterien-Gemisches bestimmte Gewebe, Filterpapier usw. zu liegen kam.

Herstellung der Präparate: Nachdem die Schalen unter Plastilinverschluß für 1—2 h im Brutschrank gewesen waren, stellten wir von den Zell-Bakterien-Gemischen Klatsch- und Ausstrichpräparate her. Dabei war darauf zu achten, daß die Flüssigkeitsschicht sehr dünn wurde, da die Leukozyten beim Eintrocknen relativ großer Flüssigkeitsmengen stark schrumpfen, was die mikroskopische Übersicht sehr erschwerte. Die Präparate wurden in Methylalkohol fixiert und mit Methylenblau gefärbt.

Versuchsergebnisse.

Vorversuche:

Um für die Beurteilung der «Surface phagocytosis» eine Vergleichsmöglichkeit zu haben, haben wir zunächst eine Reihe von Vorversuchen angestellt:

1. *Phagozytose von kapsellosen avirulenten Pneumokokken*². Aus einer 14-h-Rinderserum-Bouillonkultur stellten wir nach der angegebenen Technik ein Phagozyten - Pneumokokken - Gemisch her, verbrachten davon je einen Tropfen auf ein Filterpapier und glattes Glas und ließen den Rest im Reagenzglas im Schaukelapparat bei 37°. Nach 60' wurden Klatsch- bzw. Ausstrichpräparate hergestellt, getrocknet, fixiert und gefärbt. Tabelle I gibt die Resultate von 2 solchen Versuchen wieder.

TABELLE I.

	Zeit in Minuten	Kontaktfläche	Pneumokokken- haltige Zellen in ‰ auf 200	Durchschnittszahl der phagozytierten Pneumo- kokken pro Leukozyt mit Phagozytose
1. Versuch:	60	Filterpapier	14	2,7
		Glas glatt	6	1
		Reagenzglas	5	1,4
2. Versuch:	60	Filterpapier	15	3
		Glas glatt	10	3
		Reagenzglas	11	2,7

Die Leukozyten haben, wie zu erwarten war, in allen 3 Versuchsanordnungen lebhaft phagozytiert, die rauhe Filterpapierunterlage scheint den Vorgang zu erleichtern.

2. *Phagozytose von virulenten mit Anti-Pneumokokkenserum versetzten Pneumokokken.*

In dem im Reagenzglas mit 20 E. Lederle-Serum versetzten Phagozyten-Pneumokokken-Gemisch stellten wir zunächst die bekannte intensive Phago-

² Den Stamm verdanken wir Frl. Dr. R. K. Grilichess, die ihn am Institut für eigene Zwecke über Anti-Pneumokokkenserumpassagen gewonnen hatte.

zytose (10 und mehr Pneumokokken pro Zelle) fest. In Gegenwart von mehr Serum war die Phagozytose als Ausdruck des Prozonophänomens vermindert (39).

Dieser Versuch wurde nun so ausgebaut, daß ein Teil des serumhaltigen Gemisches in der angegebenen Weise auf Filtrierpapierscheibchen verbracht, der Rest im Reagenzglas im Schaukelapparat bei 37° verblieb. Im Abstand von je 30' wurden bis zu 2½ Stunden Klatsch- bzw. Ausstrichpräparate angefertigt und darin je 200 Leukozyten ausgezählt. Tab. II gibt die entsprechenden Werte wieder, wozu zu bemerken ist, daß die Zahl der pro Zelle phagozytierten Pneumokokken recht erheblich (bis 12) war.

TABELLE II.

Zeit in Minuten	Milieu	Pneumokokkenhaltige Zellen in %
30	auf Filterpapier	24
	im Reagenzglas	6
60	auf Filterpapier	12
	im Reagenzglas	15
90	auf Filterpapier	31
	im Reagenzglas	23
120	auf Filterpapier	36
	im Reagenzglas	22
150	auf Filterpapier	50
	im Reagenzglas	39

Man hat auch hier durchaus den Eindruck, daß die feste rauhe Unterlage der Phagozytose förderlich ist, andererseits ist aber bei der Bewertung zu berücksichtigen, daß die Klatschpräparate an sich bessere Resultate zeitigen als die Ausstriche aus den Reagenzröhrchen, in denen sich trotz der Schaukelapparatur eine gewisse Sedimentation nicht vermeiden läßt.

Hauptversuche:

1. Phagozytose von virulenten Pneumokokken in Gegenwart von Sulfonamiden und Penicillin.

Trotz den zahlreich vorliegenden negativen Ergebnissen haben wir das spezifische Pneumokokkenserum in einer weiteren Versuchsserie durch Sa und Penicillin ersetzt. Die Pneumokokken des zweimal in Tyrode gewaschenen Sediments einer 14stündigen Serum-Bouillonkultur wurden mit 20 mg% Elkosin, Sulfadiazil, Sulfapyridin, 40 E, Penicillin und vergleichsweise 20 E, Antipneumokokkenserum pro ccm versetzt und in den Brutschrank verbracht. (Sa und Penicillin wurden vorgängig in der gewünschten Konzentration in Tyrode gelöst.) Nach 6 Stunden Brutschrankaufenthalt wurden die frisch aus dem Meerschweinchen gewonnenen Phagozyten zugesetzt und das Gemisch bei 37° im Schüttelapparat gehalten. Ausstriche nach 120 und 180 Minuten. Tabelle III gibt die gefundenen Phagozytenwerte auf 200 gezählte Zellen wieder.

TABELLE III.

Zeit in Minuten	Chemotherapeuticum	Pneumokokken-haltige Zellen in % auf 200	Durchschnittszahl der phagozytierten Pneumokokken pro Leukozyt mit Phagozytose
120	Elkosin	5,3	1
	Diazil	2,8	1
	Anti-Pneumokokkenserum	81	viele
	Kontrolle	8	1
180	Elkosin	6,6	1
	Diazil	2	1
	Sulfapyridin	5,5	1
	Penicillin 40 E.	4	1
	Anti-Pneumokokkenserum	88	viele
	Kontrolle	6	1

Die angeführten Zahlen zeigen zunächst, daß die in Tyrodelösung aufgeschwemmten und während 6 h bei 37° gehaltenen Pneumokokken — wohl zufolge Kapselschädigung — auch im Reagenzglas in geringem Ausmaß phagozytiert werden. Durch die Sa- bzw. Penicillinzusätze wird diese «Normal»-Phagozytose aber nicht gesteigert, wogegen der Zusatz des spezifischen Anti-pneumokokkenserums die bekannten hohen Werte zeitigt.

2. Phagozytose virulenter Pneumokokken nach Wood.

In Wiederholung der Woodschen Versuchsanordnung verbrachten wir das Leukozyten-Pneumokokken-Gemisch parallel auf Filtrierpapier-Scheibchen und polierte Objektträger und kontrollierten und verglichen die bei 37° vor sich gehende Phagozytose nach 60, 90, 120 und 240 Minuten mit der im Reagenzglas. Tabelle IV gibt ein solches Protokoll für 2 und 4 Std. Kontaktzeit wieder; nach 60 und 90 Minuten war die Phagozytose noch zu gering.

TABELLE IV.

	Zeit in Minuten	Kontaktfläche	Pneumokokken-haltige Zellen in % auf 200	Durchschnittszahl der phagozytierten Pneumokokken pro Leukozyt mit Phagozytose
1. Versuch:	120	Filterpapier	16	2,1
		Glas glatt	2,5	1,2
		Reagenzglas	3	1
2. Versuch:	120	Filterpapier	20	2,5
		Glas glatt	4	1
		Reagenzglas	2,6	1
	240	Filterpapier	23	3,4
		Glas glatt	2	1
		Reagenzglas	2,5	1

Diese und eine Reihe weiterer Zahlen, auf deren Wiedergabe wir verzichten, belegen in eindrucklicher Weise, daß entspre-

chend der Woodschen These die Unterlage für die in vitro vor sich gehende Phagozytose von entscheidender Bedeutung ist und daß virulente, kapselhaltige Pneumokokken auf rauher Unterlage tatsächlich in einem in den einzelnen Versuchen zeitlich zwar wechselnden (Maximum nach 1—4 h), stets aber erheblichen Ausmaß phagozytiert werden. Schon nach 45—60 Minuten finden sich Leukozyten, die einzelne Pneumokokken enthalten. Nach 2 h stößt man auf Zellen, die in ihrem Plasma mehrere z. T. sehr distinkt, z. T. nurmehr sehr schwach gefärbte Pneumokokkenpaare — oft in einer Verdauungsvakuole gelegen — eingeschlossen haben.

Auf die Wiederholung der Woodschen Versuche auf Schnitten formalinfixierter Lungen haben wir nach langen Bemühungen verzichten müssen, da die Lungen nach dem tagelangen Auswaschen im laufenden Wasser jeweils so viele Wasserkeime enthielten, daß eine Beurteilung der Pneumokokken-Phagozytose nicht mehr möglich war.

Dagegen versuchten wir uns davon zu überzeugen, daß das Filterpapier an sich nicht etwa chemisch die Pneumokokken beeinflusste. Zu diesem Zweck tropften wir eine tyrodegewaschene 14stündige Serumbouillonkultur parallel auf Filtrierpapier und Agarklötzchen auf, hielten die Präparate in Petri-Schalen in der eingangs erwähnten Weise bei 37° und fertigten nach 4 und 18 Stunden Klatschpräparate an. Diese wurden mit Bouinscher Lösung fixiert und tanningebeizt und kristallviolett gefärbt. Die Methode liefert sehr schöne Bilder — ein Unterschied zwischen den beiden Präparaten war aber nie feststellbar — so daß eine chemische Beeinflussung der Pneumokokken und vor allem auch ihrer Kapseln als ausgeschlossen gelten kann.

Die von Wood postulierte Oberflächenabhängigkeit der Phagozytose besteht als solche somit zweifellos zu Recht. Eine ganz andere Frage aber ist, ob und inwieweit diese in-vitro-Versuche mit extravasalen Zellen zur Erklärung der Sa-Therapie-Resultate herangezogen werden dürfen. Zunächst bleibt ja die Tatsache immer noch bestehen, daß die Phagozytose im Ausstrich der intraperitoneal infizierten und erfolgreich Sa-behandelten Maus nicht zu finden ist — und das trotzdem das Peritonealepithel in vitro die Phagozytose wie Filtrierpapier ermöglichen soll. Das läßt doch wohl daran denken, daß die in-vitro-Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Vorgänge in vivo übertragen werden dür-

fen. Daß dem so ist, hat nun aber *Oerskov* (40) bereits 1940 gezeigt.

Wie zahlreiche andere Autoren konnte auch *Oerskov* bei der intraperitoneal mit Pneumokokken-Typ I infizierten weißen Maus keine Phagozytose finden. Verteilte er jedoch einen Tropfen der Peritonealflüssigkeit eines solchen Tieres auf ein auf einem Objektträger montiertes Agarscheibchen, so konnte er bei direkter Mikroskopie des mit einem Deckgläschen bedeckten Präparates die Phagozytose freier Pneumokokken beobachten. Diese Phagozytose spielte schon wenige Stunden nach der Infektion — zu einer Zeit also, wo auch bei vorsichtiger Wertung spezifische Antikörper noch nicht in Rechnung gestellt werden können. *Oerskov*, dem somit unzweifelhaft die Priorität für die Entdeckung des von Wood als «Surface phagocytosis» beschriebenen Phänomens zukommt, schreibt dazu: «Es ist also festzuhalten, daß die gleichen Leukozyten, die im Peritoneum nicht imstande sind, eingekapselte Pneumokokken aufzufressen, dies an der Agaroberfläche ohne Schwierigkeit tun.» *Oerskov* betont allerdings zu Recht, daß diese Versuche mühsam sind. Wenn man aber die nötige Zeit und Sorgfalt darauf verwendet, so sind sie — wie wir uns überzeugen konnten — ohne allzu große Schwierigkeiten zu reproduzieren.

Technik: Einer gesunden Maus injiziert man intraperitoneal 1 ccm einer 14stündigen Serumbouillonkultur, entblutet sie nach 3—4 Stunden und entnimmt nach steriler Öffnung mittels einer Pasteur-Pipette das Exsudat. Davon bringt man einen kleinen Tropfen auf einen auf sauberem Objektträger montierten 1,5—2 cm² messenden Agarblock von 2—3 mm Dicke. Der Tropfen wird durch leichtes Hin- und Herschwenken verteilt und mit dünnen Deckgläschen bedeckt. Dieses Präparat haben wir im Dunkelmzimmer — ohne wesentlichen Vorteil z. T. auch auf geheiztem Objektisch — mit starker Lichtquelle direkt mikroskopiert, was die Beobachtung, worauf schon *Oerskov* hinwies, wesentlich erleichtert. Nach Beruhigung der Flüssigkeitsströmung sucht man sich — und das ist die Schwierigkeit — einen zur Phagozytose befähigten Leukozyten mit in der Nähe liegenden Pneumokokken, wenn möglich in Randstellung. Hat man eine geeignete Stelle gefunden, so sieht man nun sehr hübsch das Ausstrecken und Einziehen der Pseudopodien, Hin und wieder stößt man auf eine Zelle, in der sich bereits ein Pneumococcus findet. Es ist vorteilhaft, gerade solche Zellen weiter zu verfolgen. Findet sich ein weiterer Diplococcus in der Nähe, so stößt dieser Leukozyt langsam ein Pseudopodium aus, das mit dem Bakterium Kontakt sucht. Darum schieben sich von beiden Seiten her kleinere Fortsätze vor und umfassen das Bakterium allmählich. Mit dem Zurückziehen des Pseudopodiums wird das Bakterium der Zelle einverleibt. Gelegentlich kann man dann nach einiger Zeit die Entstehung einer Vakuole beobachten. Man kann nun auch das Deckgläschen wie-

der abnehmen, fixieren und färben und das ganze Präparat auf phagozytierte Pneumokokken untersuchen.

Wir haben nun dieselbe Technik auch für das *in vitro* hergestellte Pneumokokken-Leukozyten-Gemisch angewandt und mit dem genau gleichen Resultat. Die Zahl der phagozytierenden Zellen bleibt zwar wesentlich hinter der auf Filtrierpapier beobachteten zurück, aber die Phagozytose findet auch auf dieser sehr glatten Agaroberfläche statt.

Schlußfolgerungen:

In Übereinstimmung mit *Oerskov* vermochten wir die extravasale Phagozytose hochvirulenter bekapselter Pneumokokken in direkter Mikroskopie zu verfolgen, und in Übereinstimmung mit *Wood* stellten wir die Abhängigkeit der Intensität dieser Phagozytose von der Unterlage fest. Im Gegensatz zu *Wood* glauben wir aber, daß das von ihm beschriebene Phänomen nicht ausreicht, um die Bedeutung der Phagozytose beim Sa-behandelten Pneumoniker bzw. beim pneumokokkeninfizierten Tier zu belegen. Wir konnten keinen Anhaltspunkt dafür finden, daß der Phagozytose für die Sa-Therapie der Pneumokokkeninfektion eine wesentliche Bedeutung zukommt. Wodurch der Unterschied zwischen extravasalem und intravitalem Verhalten der Leukozyten bedingt ist, erscheint auch durch die *Woodschen* Versuche nicht abgeklärt. Die Tatsache aber, daß auf der Agaroberfläche eine Phagozytose zu beobachten ist, die in der Peritonealhöhle bisher nicht gefunden werden konnte, weist auf einen grundsätzlichen Unterschied des Phagozytosevermögens *in vitro* und *in vivo* hin. Damit aber hängt auch die von *Boivin* und *Delaunay* (41) verfochtene These, die den «médicaments bactériostatiques» nur «un rôle adjuvant» läßt, «en freinant la multiplication de ces germes et en soulageant d'autant la tâche des phagocytes», was die Pneumokokken anbelangt, bis auf weiteres in der Luft.

Die Frage, was mit den unter Sa-Wirkung stehenden Pneumokokken geschieht, ist somit nach wie vor nicht gelöst. Daß ein Teil derselben durch Phagozytose entfernt werden kann, scheint festzustehen. Ebenso sicher darf aber angenommen werden, daß diese Phagozytose weder an die opsonisierende Wirkung von Antikörpern noch an einen bisher nie nachgewiesenen kapselschädigenden Einfluß der Sa geknüpft ist. Damit bleibt aber schließlich nur noch die Annahme einer Enzymwirkung übrig —

eine Annahme, die experimentell durchaus gestützt erscheint. So hat *Bieling* (42) gezeigt, daß unter Serumwirkung stehende Pneumokokken keineswegs nur über Phagozytose beseitigt werden können, sondern selbst in agglutiniertem Zustand schon nach 8 Stunden infolge lytischer Vorgänge bis auf geringe Reste verschwunden sind.

In Gegenwart der nachgewiesenermaßen weniger oder überhaupt nicht oberflächenaktiven Sa wird nicht mit so kurzen Zeiten gerechnet werden können. Leider vermochten die von *Gärtner* (43) nach dem Vorschlag von *Strugger* mit Akridinorange vorgenommenen Vitalfärbungen an unter Sa-Einfluß stehenden Bakterien vorläufig nicht das zu halten, was sich der Autor davon versprochen hatte, indem die Intensität der Färbung nicht so eindeutig, wie es ursprünglich schien, zwischen lebend und tot zu differenzieren gestattet. Immerhin vermag die von *Gärtner* empfohlene vergleichende kulturelle fluoreszenz- und elektronenoptische Methode, zusammen mit einem geeigneten Vitalfarbstoff, vielleicht doch eines Tages die von *Dubos* (l. c. p. 92) seit Jahren in den Vordergrund gestellte Aktivität der autolytischen Enzymsysteme morphologisch zu belegen.

Zusammenfassung.

In Anlehnung an die Versuche *Woods* und seiner Mitarbeiter wird gezeigt, daß der von ihm geprägte Begriff der «Surface phagocytosis» zu Recht besteht, aber als eine in-vitro-Erscheinung zu deuten ist, die als solche bereits früher von *Oerskov* bekanntgegeben wurde. Den Sulfonamiden kommt ein rein bakteriostatischer, aber kein opsonisierender Einfluß zu. Die Pneumokokkenphagozytose wird durch Sulfonamide nicht gesteigert — für ihre Entfernung aus dem erkrankten Organ sind offenbar in erster Linie autolytische Enzymsysteme verantwortlich.

Résumé.

Se basant sur les expériences de *Wood* et al., l'auteur montre que la notion de «Surface phagocytosis» est bien fondée, mais que ce phénomène — connu d'ailleurs depuis les travaux d'*Oerskov* — ne se manifeste qu'in vitro. Les sulfamidés n'agissent que par voie bactériostatique et n'ont aucun effet opsonique. La phagocytose des pneumocoques n'est pas favorisée par les sulfamidés. Ce sont avant tout des ferments autolytiques qui les font disparaître de l'organe atteint.

Riassunto.

In riferimento agli esperimenti di Wood e collaboratori, vien dimostrato che il concetto da lui propugnato di « superficie di fagocitosi » è veramente fondato, ma che è da considerarsi come un fenomeno che appare in vitro, e come tale già da tempo divulgato da Oerskov. L'azione dei sulfamidici è esclusivamente batteriostatica, nessuna azione opsonica fu dimostrata. La fagocitosi dei pneumococchi non è aumentata dai sulfamidici, in prima linea sono sistemi enzimatici autolitici responsabili dell'allontanamento di questi dall'organismo.

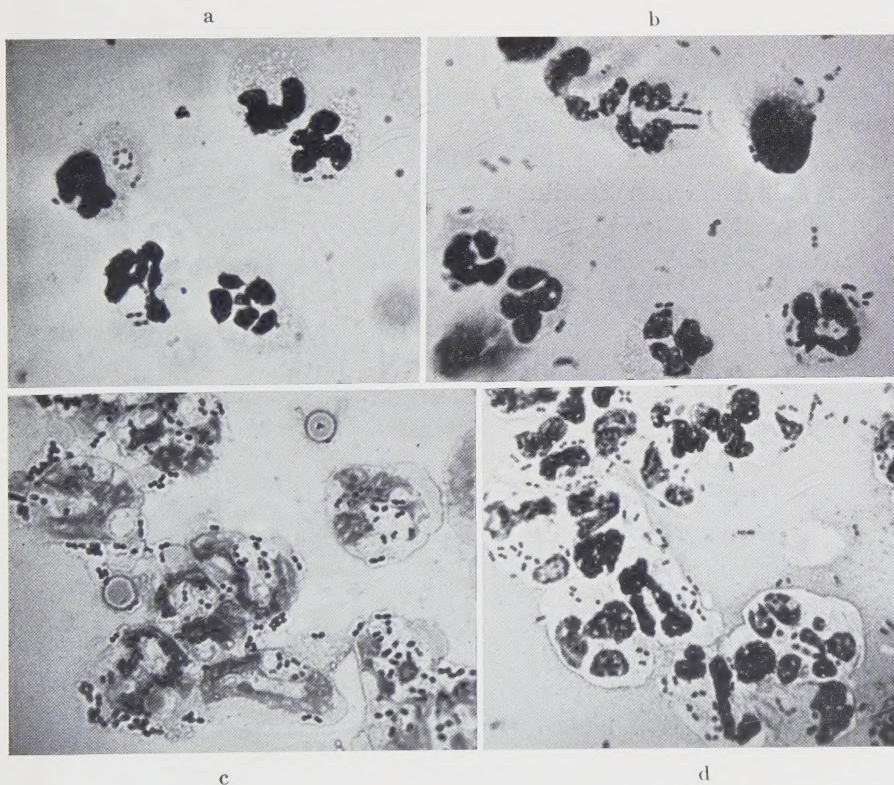
Summary.

The concept of surface phagocytosis proposed by Wood is an in vitro phenomenon. This phenomenon had previously been described by Oerskov. Sulfonamides have a purely bacteriostatic action but no opsonizing effect, they do not enhance the phagocytosis of pneumococci. Their disappearance from the organism is mainly due to their autolytic enzyme system.

Literatur.

1. Dubos, R. J., The Bacterial Cell, Harvard University Press, Cambridge Mass. 1946, p. 315. — 2. Hirsch, J., C. R. Soc. Turque Sci. phys. et natur. 10, 1 u. 144, 1942. — 3. Jordan, P., Radiologica 2, 16 u. 166, 1938. — 4. Lea, D. E., R. B. Haines and E. Bretscher, J. Hyg. 41, 1, 1941. — 5. Robinow, C. F., Addendum in Dubos l.c. — 6. Grumbach, A., Schw. Z. Path. Bakt. 11, 494, 1948. — 7. McLeod, J. W., A. Mayr-Harting and N. Walker, J. Path. Bact. 56, 377, 1944. — 8. Domagk, G., u. C. Hegler, Chemotherapie bakterieller Infektionen, S. Hirzel, Leipzig 1944. — 9. Domagk, G., Pathologische Anatomie und Chemotherapie der Infektionskrankheiten, G. Thieme, Stuttgart 1947. — 10. Grumbach, A., Praxis 51, 929, 1944. — 11. Levaditi, C., und A. Vaisman, C. R. Soc. Biol. 119, 946, 1935; Levaditi, C., Schw. Z. Path. Bakt. 1, 365, 1938. — 12. Spink, W. W., und C. S. Keefer, J. Clin. Invest. 15, 21, 1936. — 13. Bliss, E. A., und P. H. Long, J. Amer. Med. Assoc. 109, 1524, 1937; The Clinical and Experimental Use of Sulphanilamide, Sulfapyridine and Allied Compounds. The Macmillan Cy., New York 1939. — 14. Hoare, E. B., Lancet 1938, I, 655. — 15. Haag, F. E., Z. Hyg. 124, 636, 1943. — 16. Winkler, A., Zbl. Bakter. I, Orig. 151, 106, 1944. — 17. Levaditi, C., A. Vaisman u. Krassnoff, Bull. Acad. Méd. 119, 553, 1938. — 18. Oelrichs, L., Zschr. Immun.forsch. 88, 431, 1936. — 19. Neufeld, F., u. F. Bär, Z. Hyg. 123, 116, 1940. — 20. Reiner, L., u. Oe. Fischer, Z. Immun.forsch. 61, 317, 1929; Reiner, L., u. H. Kopp, Z. Immun.forsch. 61, 397, 1929. — 21. Schloßberger, H., Rep. Proc. Sec. Internat. Congr. Microbiol. 1937, p. 287. — 22. Lushbaugh, C. C., u. P. R. Cannon, J. Inf. Dis. 71, 33, 1942. — 23. Hofmann, P., Z. Hyg. 125, 556, 1944. — 24. Grumbach, A., u. K. R. Grilichess, Helv. Med. Act. Sez. A, 14, 231, 1947. — 25. Wood, B. W., Ch. McLeod u. E. N. Irons, J. Exp. Med. 84, 377, 1946. — 26. Friedemann, U.,

u. A. Schönfeld, *Bioch. Zschr.* 80, 312, 1917. — 27. Ward, H. K., u. J. F. Enders, *J. Exp. Med.* 57, 527, 1933. — 28. Wood, B. W., u. E. N. Irons, *J. Exp. Med.* 84, 372, 1946. — 29. Hegglin, R., *Die Chemotherapie der Pneumonien*, G. Thieme, Leipzig 1942. — 30. Fildes, P., *Brit. J. Exp. Path.* 21, 67, 1940; *Lancet* 1940, 955. — 31. Grumbach, A., *Schw. Z. Path. Bakt.* 9, 395, 1946. — 32. Baker, Z., R. W. Harrison u. B. F. Miller, *J. Exp. Med.* 74, 611, 1941. — 33. McLeod, C. M., u. E. R. Stone, *Bull. New York Acad. Med.* 21, 375, 1945. — 34. Harris, A. H., u. J. K. Miller, *J. Bact.* 41, 495, 1941. — 35. Harrison, P. E., *J. Infect. Dis.* 79, 101, 1946. — 36. Wood, B. W., M. R. Smith u. B. Watson, *J. Exp. Med.* 84, 387, 1946. — 37. Smith, M. R. u. W. B. Wood, *J. Exp. Med.* 86, 257, 1947. — 38. Wood, B. W., M. R. Smith u. B. Watson, *Science*, 104, 28, 1946. — 39. Goodner, K., u. F. L. Horsfall, *J. Exp. Med.* 62, 359, 1935. — 40. Oerskov, J., *Z. Immunforsch.* 98, 174, 1940. — 41. Boivin, A., et A. Delaunay, *Phagocytose et Infections*, Paris, Hermann et Cie., 1947. — 42. Bieling, R., *Medizin und Chemie III*, 89, 1936, «Bayer», Leverkusen a. Rh. — 43. Gärtner, K., *Zbl. Bakt. I. Orig.* 150, 97, 1943.



Phagozytose virulenter Pneumokokken auf Filtrierpapier
a) nach 2 Stunden; b) nach 4 Stunden.
Phagozytose auf Ascites-Agar nach 4 Stunden: Peritonealexsudat aus der
Maus (c); d) Gemisch von in Tyrode gewaschenen Meerschweinchen-
Leukozyten und Pneumokokken.

Curriculum vitae.

Am 16. November 1919 wurde ich als Sohn des Dr. Max Haemmerli-Lüscher, Zahnarzt in Lenzburg, geboren. In meinem Heimatorte Lenzburg besuchte ich 5 Jahre die Primarschule und 4 Jahre die Bezirksschule. Nach 4jährigem Besuch der aargauischen Kantonsschule in Aarau beendigte ich meine Gymnasialzeit im Frühjahr 1940 mit der Maturität.

Im Sommersemester 1940 immatrikulierte ich mich als stud. med. dent. an der Universität Zürich, wo ich im April 1941 die naturwissenschaftliche und im März 1943 die anatomisch-physiologische Prüfung für Ärzte bestand. Meine Fachausbildung am zahnärztlichen Institut der Universität Zürich schloß ich nach wiederholten durch Militärdienst bedingten Unterbrüchen im Oktober 1946 ab.

Nach dem Staatsexamen war ich dreiviertel Jahre in der Praxis meines Vaters als Assistent tätig. Anschließend widmete ich mich vom Juli 1947 bis April 1948 meiner Doktorarbeit. Seit ihrer Beendigung bin ich in Neuenburg in der zahnärztlichen Praxis von Dr. med. dent. A. Matthey als Assistent beschäftigt.